

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

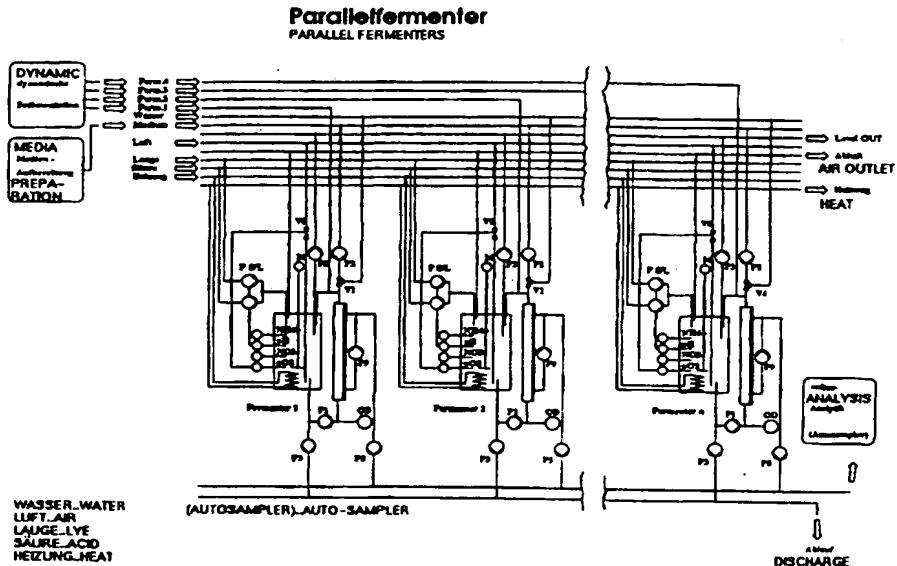
(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12M 1/36		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/36993
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Oktober 1997 (09.10.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/01473		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 22. März 1997 (22.03.97)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 12 766.1 29. März 1996 (29.03.96) DE			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): PRIVATE UNIVERSITÄT WITTEN/HERDECKE GMBH [DE/DE]; Alfred-Herrhausen-Strasse 50, D-58448 Witten (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BARTHOLMES, Peter [DE/DE]; Private Universität Witten/Herdecke GmbH, Alfred-Herrhausen-Strasse 50, D-58448 Witten (DE). ROSENTHAL, Werner [DE/DE]; Private Universität Witten/Herdecke GmbH, Alfred-Herrhausen-Strasse 50, D-58448 Witten (DE). WOLFF, Elmar [DE/DE]; Private Universität Witten/Herdecke GmbH, Alfred-Herrhausen-Strasse 50, D-58448 Witten (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			

(54) Title: PROCESS FOR ANALYSING PROPERTIES OF A BIOLOGICAL SYSTEM

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANALYSE VON EIGENSCHAFTEN EINES BIOLOGISCHEN SYSTEMS

(57) Abstract

A process for analysing properties of a biological system in which the properties of the complex biological system can be expressed by its inherent values, e.g. system parameters and values, with the stages: interference with the biological system by altering presumed or known system parameters; consistent observation of the response of the biological system to the changes by measuring at least two system values as long as said values vary and/or until there is no further change in them owing to the interference; checking the reproducibility of the changes in one or more system value(s) induced by the alteration of the system parameter(s); and repeating the process steps several times if necessary, with the proviso that system parameters are changed which have not yet been examined.

**BEST AVAILABLE COPY**

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Analyse von Eigenschaften eines biologischen Systems, wobei die Eigenschaften des komplexen biologischen Systems durch dem biologischen System inhärente Werte, wie Systemparameter und Systemgrößen, ausdrückbar sind, mit den folgenden Verfahrensschritten: Störung des biologischen Systems durch Änderung vermuteter oder bekannter Systemparameter des biologischen Systems, konsistente Beobachtung der Antwort des biologischen Systems auf die Änderung durch Messung mindestens zweier Systemgrößen solange sich die Systemgrößen und/oder bis keine Änderung der Systemgrößen durch die Störung mehr erfolgt, Prüfung der Reproduzierbarkeit der durch die Änderung des oder der Systemparameter(s) induzierten Veränderung einer oder mehrerer Systemgröße(n) und gegebenenfalls mehrfaches Wiederholen der Verfahrensschritte mit der Maßgabe, daß jeweils noch nicht untersuchte Systemparameter geändert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren zur Analyse von Eigen-
schaften eines biologischen Systems

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Analyse von Eigenschaften eines biologischen Systems, wobei die Eigenschaften des biologischen Systems durch inhärente Werte, wie Systemparameter und Systemgrößen ausdrückbar sind.

In den letzten Jahren haben sich in zunehmendem Maße biotechnologische Verfahren zur Lösung verschiedenster Problemstellungen als geeignet erwiesen. Bislang war es jedoch häufig dem Zufall überlassen, ob eine bestimmte Eignung eines bestimmten biologischen Systems für die Lösung eines Problems in Frage kam. Wenn beispielsweise die Potenz eines biologischen Systems zum Abbau bestimmter Schadstoffe in Abwässern untersucht werden mußte, konnte aufgrund der Komplexität der Untersuchungsmethoden oft keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob der ausgesuchte Mikroorganismus tatsächlich geeignet sein könnte, das zugrundeliegende Problem zu lösen. Des Weiteren ist es oftmals schwierig, Änderungen, die das biologische System planmäßig oder ungewollt erfährt, systematisch zu erfassen und gegebenenfalls die durch die Störungen des Systems hervorgerufenen Kon-

- 2 -

sequenzen analytisch zu erfassen um gegebenenfalls gegenzusteuern. Eine Erfassung ist insbesondere dann von Interesse, wenn beispielsweise ein komplexer biotechnologischer Prozeß beherrscht werden soll, oder wenn Bedingungen herausgearbeitet werden sollen, bei denen das biologische System eine Aufgabe in möglichst optimaler Weise oder möglichst optimal angepaßt lösen kann.

Im Stand der Technik wird zur Analyse eines biologischen Systems, insbesondere einer Fermentationskultur, kontinuierlich oder diskontinuierlich eine Probe entzogen. Dann werden die Proben einer Veränderung unterzogen und beobachtet, wie das biologische System darauf reagiert. In der Zwischenzeit verändert sich möglicherweise jedoch der Inhalt des Fermenters, aus dem die Probe entnommen wurde. Dies kann auf z. B. einer induzierten oder spontanen Einstellung der Zellteilung oder Beschleunigung der Zellteilung oder Anschaltung anderer Stoffwechselaktivitäten beruhen, die nicht notwendigerweise in der analysierten oder zu analysierenden Fraktion gleichermaßen erfolgen muß. Aufgrund der recht langwierigen Untersuchungsmethode sind zuverlässige Korrelationen zwischen der Änderung, die das zu untersuchende System zu erfahren hat und deren Auswirkungen und dem jeweiligen Zustand in der Fermentationsausgangslösung, nicht gewährleistet.

Des Weiteren sind frühzeitige Erkennungen von sich anbahnenden Änderungen des Zustandes der im Fermenter gezüchteten Kultur oft nicht möglich, so daß erst dann, wenn bereits eine Zustandsänderung beobachtbar eingetreten ist, Maßnahmen ergreifbar werden. Soll beispielsweise eine Kultur von Mikroorganismen daraufhin untersucht werden, ob sie im Stande ist, stickstoffhaltige Abwässer in besonders effizienter Weise abzubauen, muß erst geprüft werden, ob die zur Zeit in Anlage vorhandene Population von Mikroorganismen in der Lage ist, größere Stickstoffmengen zu bewältigen, die möglicherweise spontan im Abwasser erscheinen. Dies ist in aller

- 3 -

Regel jedoch nicht in relativ kurzer Zeit meßbar, da erst beobachtet werden muß, ob ein Stickstoffabbau einsetzt und wenn, mit welcher Intensität.

Gleiches gilt, wenn beispielsweise frühe Phasen beginnender Zellteilungsaktivität von Mikroorganismen schnell erfaßt werden müssen. Normalerweise muß abgewartet werden, bis sich die Zahl der Mikroorganismen um ein hinreichendes Vielfaches erhöht hat, was zum Beispiel durch Trübungsmessungen erfaßt werden kann.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht also unter anderem darin, ein Verfahren anzugeben, mit dem es gelingt, Bewertungen eines komplexen biologischen Systems durchzuführen, in dem bestimmte Größen des Systems erfaßt werden und korreliert werden können, mit Eigenschaften dieses Systems, um gegebenenfalls Prognosen über den Zustand des Systems oder Bewertungen des Systems durchzuführen.

Gelöst wird das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1.

Das erfindungsgemäße Verfahren analysiert die Eigenschaften eines biologischen Systems, bei dem die Eigenschaften des biologischen Systems durch inhärente Werte, wie Systemparameter und Systemgrößen ausdrückbar sind. Dabei wird das System durch Änderung vermuteter oder bekannter Systemparameter des biologischen Systems gestört. Es wird dann eine konsistente Beobachtung der Reaktion des Systems auf die Änderung durch Messung mindestens zweier Systemgrößen durchgeführt, so lange sich letztere ändern und/oder keine Änderung der Systemgrößen durch die Störung mehr erfolgt (entsprechend einer Messung vor oder bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes des Systems nach der Störung). Das Verfahren ist mithin ein dynamisches Verfahren. Ausgewertet wird die Dynamik der Reaktion des Systems, hervorgerufen

- 4 -

durch die Störung eines Parameters. Hieran schließt sich die Prüfung der Reproduzierbarkeit der durch die Änderung des oder der Systemparameter(s) induzierten Veränderung einer oder mehrerer Systemgrößen an.

Vorzugsweise befindet sich das zu analysierende biologische System vor einer ersten gezielten Änderung eines Systemparameters in einem quasi-stationären Gleichgewichtszustand bzw. ist die Geschwindigkeit eventueller Änderungen im System konstant oder das biologische System ist in dem untersuchten Bereich, beispielsweise einem Volumenelement in einem Bioreaktor, hinreichend homogen, um eine reproduzierbare Aussage zu gewährleisten.

Erfindungsgemäß lassen sich insbesondere komplexe biologische Systeme untersuchen. Dazu gehören z. B. Population verschiedener Organismen, wie Mikroorganismen, Zellen, Zellkulturen, Zellorganellen etc.

Geänderter Systemparameter und untersuchte Systemgröße können auch identisch sein. Als Systemparameter bzw. Systemgrößen können physikalische, chemische, biologische Zustände oder Erscheinungen, insbesondere solche, mit denen das System mit der Umgebung in Wechselwirkung treten kann oder Kombinationen davon, herangezogen werden. Insbesondere lassen sich als Systemparameter Temperatur, Wärmeinhalte, pH-Werte, Drucke, Partialdrucke von Gasen im biologischen System, Konzentrationen von Substanzen, wie Hormonen oder anderen in das biologische System bildende Medium abgegebene Substanzen, Anzahl biologischer Komponenten, wie Zellen, Zellaggregate, Zellorganellen gleicher oder verschiedener Sorten, heranziehen. Es lassen sich ebenso die Beobachtung des Populationsverhältnisses verschiedener biologischer Komponenten, deren Stoffwechselaktivitäten, Motilitäten, Zellteilungsraten, Änderungen im Zellzyklus, Abgabe von Stoffwechselprodukten oder Änderung des intrazellulären Stoffwechsels, Erscheinen oder Verschwinden von sekundären intra- und/oder

- 5 -

extrazellulären Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise Mykotoxinen oder Antibiotika zur Erfassung, d. h. Analyse von Eigenschaften eines komplexen biologischen Systems heranziehen. Auch genetische Erscheinungen, wie induzierte oder spontane Mutationen bzw. Variationen können als signifikante Werte zur Bewertung des Zustandes des Komplexen biologischen Systems dienen.

Konsistenz zwischen zwei Datenmengen oder Parametern im Sinne der Erfindung besteht, wenn sie zu einem gemeinsamen zeitlichen und/oder räumlichen Systemzustand gehören. Konsistente Beobachtung der Reaktion des Systems auf die durchgeführte Änderung bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung auch, daß möglichst gleichzeitig mit der Änderung eines Systemparameters die Reaktion des Systems auf diese Änderung einsetzt. Werden beispielsweise mehrere vergleichende Zyklen des erfindungsgemäßen Verfahrens simultan durchgeführt, in denen zwecks Absicherung statistischer Verhältnisse dieselben Parameter geändert werden, oder aber zur Erfassung möglichst vieler unterschiedlicher Systemparameter durchgeführt, ist es unbedingt erforderlich, eine möglichst zeitnahe Beobachtung durchzuführen, um eine verlässliche Korrelation der in den unterschiedlichen Zyklen des erfindungsgemäßen Verfahrens, die zeitlich parallel laufen, zu ermöglichen.

Außerdem ist es durch die konsistente Erhebung der Daten erst möglich, zeitlich miteinander in Verbindung stehende Prozesse (nicht unbedingt zeitgleiche) zu ermitteln, und so dynamische Modelle für das biologische System zu erstellen.

Die Durchführung der konsistenten Beobachtung erfolgt vorzugsweise in mindestens zwei Parallelansätzen und/oder Beobachtungsräumen. Hier kommen als besonders geeignete Vorrichtungen sogenannte Parallelfermenter in Frage, bei denen in mehreren Kammern die komplexen biologischen Systeme, die aus einer authentischen Probe abgeleitet sind, auf ihre

- 6 -

Reaktion hinsichtlich der Änderung von Systemparametern untersucht werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist mithin ein Verfahren, bei dem die konsistente Beobachtung in einer Anordnung von mindestens zwei parallel unter sonst gleichen Bedingungen geführten Fermentern erfolgt.

In Fig. 1 ist eine typische Parallelfermenterkonstruktion zum Messen von konsistenten Zuständen eines biologisch Systems dargestellt. In diesem Falle ist der Fermenter auf das Messen von Nitrifiziererleistung mikrobiologischer Systeme spezialisiert. Der Parallelfermenter besteht aus mindestens zwei Fermentereinheiten.

Allgemein hat ein solcher Parallelfermenter

1. die Eigenschaft prinzipiell während paralleler Fermentation die Bedingungen so gleich wie möglich zu halten.
2. Unabhängig von einzelnen Fermentereinheiten in jeweils einzelnen die veränderbaren Parameter gezielt dynamisch computergesteuert zu modifizieren und die Antworten auf die verschiedenen Parameteränderungen in den unterschiedlichen Fermentereinheiten mit Hilfe von Sensoren an das übergeordnete Rechnersystem zu übertragen, um dort mittels analytischer Verfahren die Daten zu bearbeiten.

Jeder einzelne Fermenter oder Fermentereinheit des Parallelfermentersystems entspricht in Aufbau und Funktion dem Prinzip eines Bioreaktors. In den jeweiligen Fermentergefäßen können parallele Proben aus einem Hauptprozeß untersucht werden.

- 7 -

Diese können sowohl möglichst gleichen Bedingungen unterworfen, als auch verschieden behandelt werden. Ebenso ist es mit Hilfe des Parallelfermentersystems möglich, mehrere Proben auf unterschiedliche Weise zu behandeln, während in einem Reaktionsgefäß eine Standardmethode durchgeführt wird um die erhaltenen Ergebnisse aus den behandelten Fermentationen zu verifizieren.

In gleicher Weise können mit dem Parallelfermentersystem auch Proben unterschiedlicher Herkunft unter gleichen Bedingungen fermentiert werden.

Bevorzugt ist dabei, daß die Beprobung konsistent, z. B. möglichst zeitgleich oder zeitnah und aus dem gleichen oder einem nahen Bereich innerhalb des Fermenterinhalts des Hauptprozesses stattfindet.

Fig. 1 zeigt schematisch den Aufbau eines Parallelfermenters.

Die Fermenter des Parallelfermentersystems werden über Sammelleitungen mit den zur Fermentation notwendigen Betriebsstoffen versorgt. Die Betriebsstoffe werden z. B. durch Öffnungen im Fermenterdeckel zugeführt.

Dies können im einzelnen sein Wasser, Medium, Luft, Lauge, Säure. Die Versorgung des Heizsystems mit warmem bzw. gekühltem Wasser erfolgt in ähnlicher Weise. Das Heizsystem ist beispielsweise in Form einer Stahlrohrschiife ausgeführt, welche sich z. B. unmittelbar über dem Boden des Fermentergefäßes befindet.

Die Betriebsstoffe werden vorzugsweise gepumpt, sofern es sich um flüssige Komponenten handelt. Gasförmige Stoffe werden vorteilhafterweise mit Überdruck, durch z. B. Einrichtungen zur Vergrößerung der wirksamen Oberfläche der entstehenden Gasblasen, wie beispielsweise Sinterfritten in die Fermentationsbrühe geleitet.

- 8 -

Ferner werden durch Deckelöffnungen verschiedene Sensoren zur quantitativen Bestimmung unterschiedlicher Inhaltsstoffe in den Reaktionsraum geführt.

Hierzu zählen zum Beispiel pH-Sensoren und pO₂-Sensoren. Diese Sensoren ermöglichen eine exakte Steuerung des pH- bzw. pO₂-Wertes durch Steuerung der Säure- und der Laugepumpe sowie des Gaszustromes.

Die Abluft wird insbesondere über die Deckelöffnungen in eine Sammelleitung geführt und in geeigneter Weise abgeleitet.

Zur Niveauregulierung dienen zwei Rohrleitungen, von denen eine vom Deckel bis in die Nähe des Gefäßbodens reicht, während die zweite in Höhe des gewünschten Flüssigkeitsniveaus endet. Durch geeignete Kombination von Pumpen, ist die kontinuierliche Einhaltung eines bestimmten Flüssigkeitspegels im Fermentationsraum erreichbar.

Als Reaktionsgefäß dient ein unten geschlossener Glaszyylinder mit einem Volumen von 1,5 l. Vorzugsweise wird das Fermentationsmedium von oben durch den Deckel mit einem Flügelrührer ständig durchmischt. Diese Durchmischung gewährleistet zum Beispiel eine hohe Meßgenauigkeit durch die Sensoren.

Zur Überwachung des Fortgangs der Fermentation, ist die Kontrolle der Inhaltsstoffe im Fermentationsmedium vorteilhaft. Dies kann zum Beispiel das Organismen enthaltende Medium sein, welches insbesondere nicht steril aus dem ablaufenden Probenstrom entnommen und danach analysiert werden kann. Ebenso ist es möglich, zellfreie Proben aus dem Fermenter zu entnehmen um extrazelluläre Stoffwechselendprodukte oder ähnliches zu quantifizieren. Zu diesem Zweck wird aus dem ablaufenden Medium, z. B. mittels einer Pumpe, ein Teilvolumen entnommen und über eine Filtrationseinheit, wie Cross-Flow-Filtrations-Einheit, geführt, wobei durch Beaufschlagen des Flüssigkeitsstromes mit einem Transmembrandruck,

- 9 -

z. B. von 0,5 bar, eine Filtration an der Membran der Cross-Flow-Filtrations-Einheit erreicht wird, die über lange Zeit einen kontinuierlichen, zellfreien Probenstrom gewährleistet.

Das Füllen des Reaktorgefäßes mit dem zu untersuchenden Medium geschieht automatisch durch Umschalten verschiedener Magnetventile. Ebenso werden automatische Spülzyklen durchgeführt.

Die Steuerung der Prozesse erfolgt über Sensoren, vorzugsweise selbstregelnde oder computerkontrollierte Sensorstrecken.

Zu diesen Sensoren gehören z. B. pH-Sensoren. Nach einem vom Prozeßleitsystem vorgegebenen Sollwert, regeln diese Sensorstrecken den jeweiligen Meßparameter selbstständig, wobei ein Meßverstärker und ein Regler für die Aufbereitung der Daten sorgen.

Die zur Prozeßsteuerung notwendigen Sensoren sind vorzugsweise mit einem Meßumwandler verbunden. Die von diesem Meßumwandler ausgehenden Signale werden z. B. über serielle Schnittstellen an einen Meßrechner weitergeleitet. Dieser Rechner bereitet die ermittelten Daten in geeigneter Weise auf und stellt sie dem übergeordneten Prozeßleitsystem zur Verfügung.

Mit Hilfe der Sensoren kann in einem Prozeßleitrechner eine quasi-Abbildung des Parallelfermentersystems geschaffen werden, welche umso genauer, d. h. schärfer wird, je mehr geeignete Sensoren dem System zur Verfügung stehen.

Ebenso besteht die Möglichkeit, den Parallelfermenter an ein übergeordnetes Modellsystem anzukoppeln. Durch rechnergesteuerte Pumpen kann die Kontrolle der Geschwindigkeit und die Menge der zudosierten Medienkomponenten in der Weise

- 10 -

erfolgen, daß der Prozeß entlang eines vorgegebenen Modells geführt wird.

Hierbei können die Medienbestandteile dynamisch an die durch den Prozeß veränderten Bedingungen angepaßt werden.

Aufgrund der konsistent erhobenen Daten können Dynamiken unterschiedlicher Meßparameter zur Beurteilung und zur Klassifizierung von zum Beispiel Nitrifizierern herangezogen werden. Die Konsistenz bedingt weiterhin, daß Prozeßgrößen, welche nicht direkt meßbar sind, aus den erhaltenen Sensorsignalen errechnet werden können. Auf diese Weise kommt man zu völlig neuen Erkenntnissen, welche durch den Einsatz herkömmlicher Meßtechnik nicht zu erzielen wären.

Eine mögliche Methode der Gewinnung von Erkenntnissen ist die gezielte Störung von Gleichgewichten durch pulsweise Zugabe von bestimmten Nährstoffen. Durch die konsequente Beobachtung möglichst vieler verfügbarer Meßgrößen, lassen sich bereits kurze Zeit nach Aufprägen der Störung, anhand der registrierten Anfangsdynamik, Aussagen über z. B. die Leistung bestimmter Organismen im Hinblick auf den Abbau von Inhaltsstoffen von Abwasser treffen (Fig. 2 und Fig. 3).

Jedoch ist der Gleichgewichtszustand nicht zwingend erforderlich. Auch einer bereits vorhandenen Dynamik kann eine Störgröße aufgeprägt werden. Mit Hilfe bestimmter Algorithmen kann das Prozeßleitsystem auch in diesem Fall eine korrekte Bestimmung des Systemzustandes erreichen.

Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet somit beispielsweise die Erfassung und Bewertung von Abwasserbakterien auf ihre stickstoffmineralisierende Potenz.

Zur Beurteilung der veränderlichen Nitrifiziererleistung im komplexen biologischen System des Rückführungsschlammes einer Kläranlage ist es nötig, hinreichend schnelle Methoden zur

- 11 -

Verfügung zu haben. Um Horizonte sedimentierenden Klärschlammes analysieren zu können ist es nötig, parallel Zugriff auf eben diese Horizonte und deren Eigenschaften zu haben. Das Parallelfermentersystem wird gleichzeitig mit entnommener Biomasse aus den verschiedenen Horizonten angeimpft. Da es generell bei dem betrachteten biologischen System um den Abbau von Ammonium bzw. organischem Amin geht, wird dem Parallelfermentersystem der Abbau von definierten Ammoniumpulsen zu intermediärem Nitrit und endgültig Nitrat dynamisch verfolgt und dadurch die Nitrifiziererleistung charakterisiert. Durch dieses Verfahren ist es möglich, innerhalb von wenigen Stunden exakte Aussagen über die Verteilung der Nitrifiziererleistung in den Schlammhöizonten zu machen.

Bei diesem Verfahren wird durch eine mechanische Behandlung von Klärschlammflocken eine bestimmte Art Homogenisierung herbeigeführt, die es erlaubt, in einem nachgeschalteten Sedimentationsfließverfahren nitrifizierende Organismen anzureichern, um diese sodann in den Klärprozeß zurückzuführen. Da die Überprüfung der Qualität von Klassifizierungsmaßnahmen sinnvollerweise nur zeitlich geschehen kann, ist es wichtig, ein konsistentes und schnelles Verfahren zur Bestimmung von Nitrifiziererleistungen zur Hand zu haben. Das geeignete Werkzeug hierfür ist das zuvor beschriebene Parallelfermentersystem. In diesem ist es durch den Vergleich von zeitlichen Abläufen verschiedener Parameter des Stickstoffmetabolismus möglich, die jeweiligen Nitrifiziererleistungen zu bestimmen und zu vergleichen.

Das erfindungsgemäße Verfahren lässt sich zur Bewertung der Durchführbarkeit biotechnologischer Verfahren und/oder deren Optimierung in äußerst vorteilhafter Weise einsetzen.

Beispielsweise lässt sich so auch die Leistung von Mikroorganismen zunächst bewerten und anschließend optimieren. Dazu gehören sowohl solche Organismen, die zum Abbau von

- 12 -

problematischen Abfallstoffen aus der Nahrungsmittelindustrie, aus der Tierhaltung, aus der Lederindustrie usw. herangezogen werden, als auch solche, mit deren Hilfe Biochemikalien, Nahrungsstoffe oder Medikamente hergestellt werden können.

Die Erfassung der Reaktion des Systems auf die Änderung vermuteter oder bekannter Systemparameter erfolgt vorzugsweise mittels Datenerfassung durch physikalische, chemische oder biochemische Erfassungsmethoden, wie Spektroskopie, Rezeptorligandwechselwirkung oder Biosensoren, Partialdruckmeßgeräte, Durchflußzytometer, enzymatischer Reaktionen und ähnlichen an sich bekannten Methoden zur Erfassung von Systemgrößen in biologischen Prozessen, insbesondere Fermentationsprozessen.

In Fig. 2 ist dargestellt, wie die Korrelationen zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der biologischen Vitalität einer Population von *Nitrosomonas europaea*, anhand des Sauerstoffpartialdruckes und dessen Änderung in Parallelfermentern analysiert wurden. Die Population, die ein stärkeres Wachstum zeigt, hat auch vorzeitig eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate als die, die nur normal wächst. Mit Hilfe einer dynamischen Analyse des Sauerstoffpartialdruckes ist es somit möglich, im Parallelfermenter gezielt verschiedene Wachstumsverhalten von *Nitrosomonas europaea* zu analysieren.

Die vorliegende Erfindung wird anhand des folgenden Beispiels näher erläutert.

Figur 2 zeigt vier Wachstumskurven von *Nitrosomonas europaea* in vier Parallelfermentern nach gleichzeitigem Animpfen mit gleicher Konzentration in allen vier Fermentern. Im Fermenter 1 und 2 wurden die gleichen Kulturen wie in 3 und 4, jedoch nach einer kurzen Vorbehandlung, angeimpft. Die Vorbehandlung bestand in einer kurzfristigen Kältebehandlung bei -15°C bis -25°C, insbesondere -20°C. Die Kurven von 3 und 4 zeigen das

- 13 -

übliche, langsame Wachstum mit einer Verdopplungszeit von ca. 7 Tagen, während die vorbehandelten Kulturen sich nach 20 Stunden schlagartig vermehren. Diese Wachstumsaktivität ist vorher nicht detektierbar. Wie in Figur 3 dargestellt, läßt sich mit Hilfe von konsistenter Beobachtung metabolischer Parameter prospektiv dieses Verhalten vorhersagen.

Fig. 3 zeigt, daß die Sauerstoffveratmung in Fermenter 1 und Fermenter 2 bereits nach wenigen Stunden das zukünftige Teilungsverhalten ankündigt. Dabei ist sogar die verzögerte Teilung in Fermenter 2, die aber deutlich stärker ist als in Fermenter 1, im dynamischen Sauerstoffverhalten (Änderung der pO_2 (% Sättigung)) repräsentiert. Aus Fig. 2 und 3 folgt, daß durch geeignete Leitparameter und die dazugehörigen prospektiven Computermodelle bei konsistenter Beobachtung (d. h. zeitliche Datenerhebung gleicher Systemzustände) prospektive Steuerung von Hauptprozessen anhand dynamischer Datenerhebung mit Hilfe des zur Messung herangezogenen Parallelfermenters möglich ist.

- 14 -

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Analyse von Eigenschaften eines biologischen Systems, wobei die Eigenschaften des komplexen biologischen Systems durch dem biologischen System inhärente Werte, wie Systemparameter und Systemgrößen, ausdrückbar sind, mit den folgenden Verfahrensschritten:
 - Störung des biologischen Systems durch Änderung vermuteter oder bekannter Systemparameter des biologischen Systems,
 - konsistente Beobachtung der Antwort des biologischen Systems auf die Änderung durch Messung mindestens zweier Systemgrößen solange sich die Systemgrößen und/oder bis keine Änderung der Systemgrößen durch die Störung mehr erfolgt,
 - Prüfung der Reproduzierbarkeit der durch die Änderung des oder der Systemparameter(s) induzierten Veränderung einer oder mehrerer Systemgröße(n) und
 - gegebenenfalls mehrfaches Wiederholen der Verfahrensschritte mit der Maßgabe, daß jeweils noch nicht untersuchte Systemparameter geändert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das biologische System Kulturen von Mikroorganismen sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei der geänderte Systemparameter auch die beobachtete Systemgröße ist.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei physikalische, chemische, biologische Zustände oder Erscheinungen oder Kombinationen davon als Systemparameter und/oder Systemgrößen herangezogen werden.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei eine konsistente Beobachtung des Systems auf die

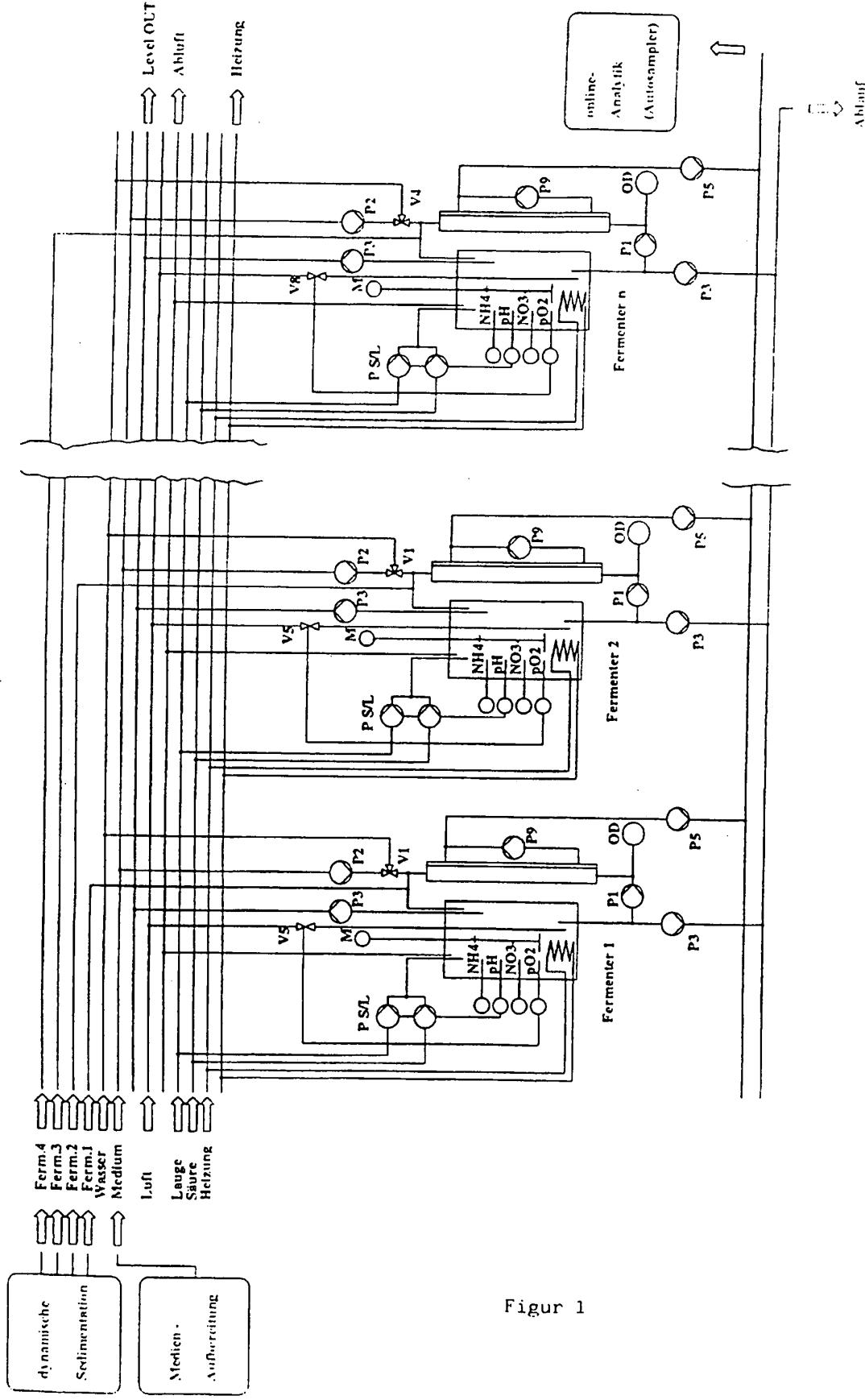
- 15 -

Änderung durch Beobachtung der Veränderung von mindestens zwei Systemgrößen in mindestens zwei Parallelansätzen und/oder Beobachtungsräumen erfolgt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die konsistente Beobachtung in einer Anordnung von mindestens zwei parallel unter sonst gleichen Bedingungen geführten Fermentern erfolgt.

1 / 3

Parallelfermenter



Figur 1

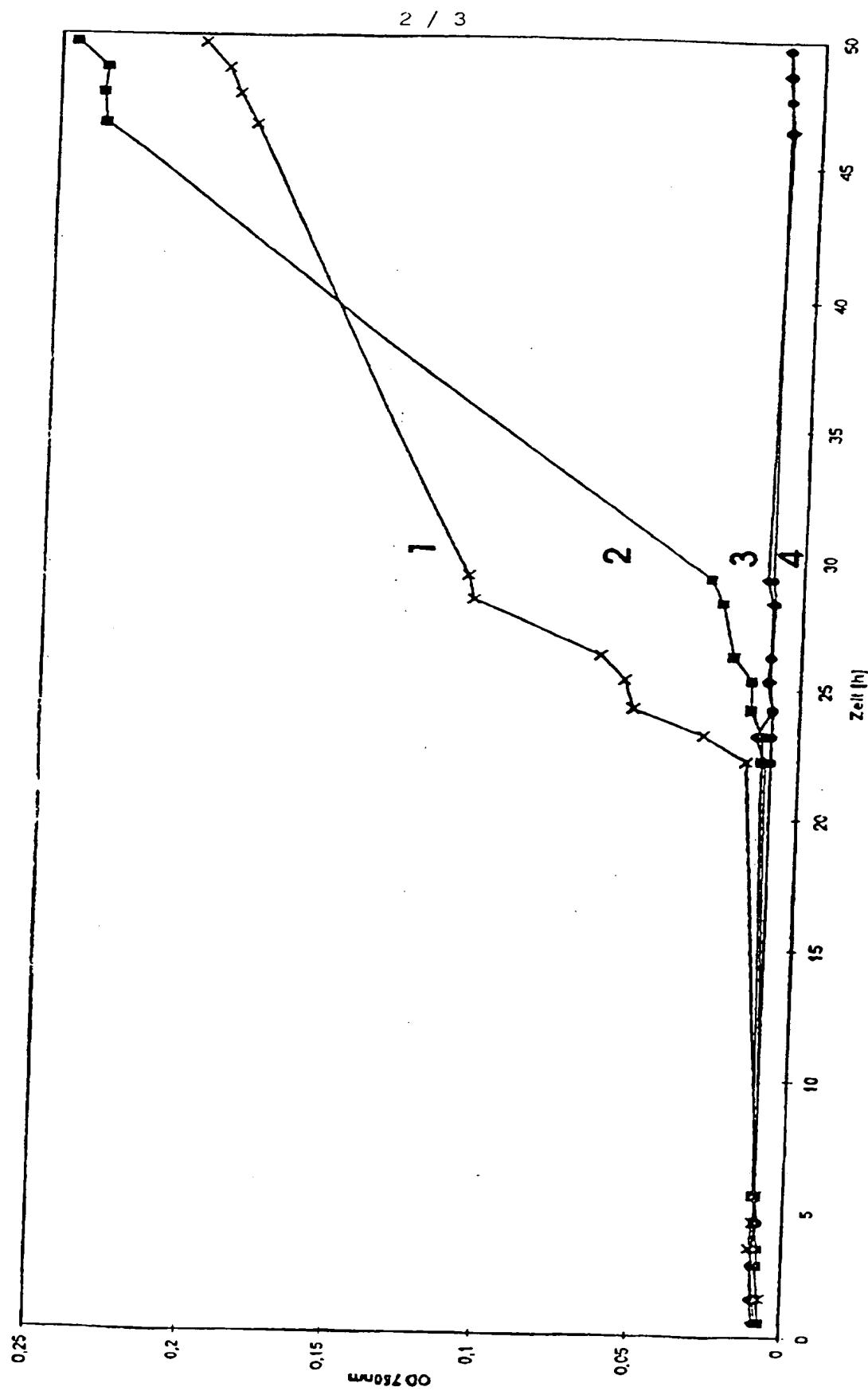


Fig. 2

3 / 3

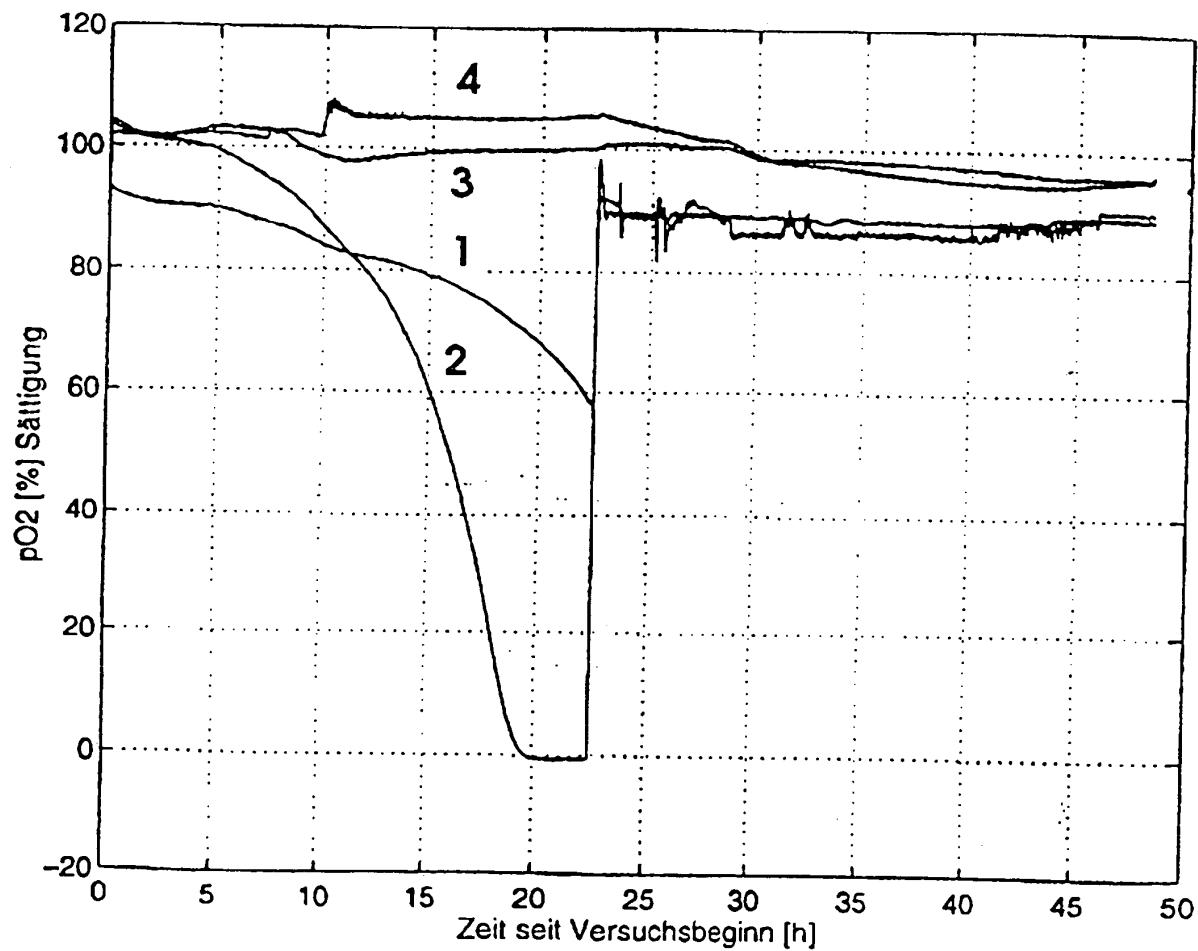


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/01473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12M1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 293 488 A (SICK PETER) 2 July 1976 see page 3, line 8 - line 28; claims; figures	1-4
Y	see page 4, line 2 - page 8, line 7 ---	5,6
X	FR 2 184 035 A (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO) 21 December 1973 see claims; figures	1-4
Y	see claims 1-6,10,21,23,28; figures ---	5,6
X	US 4 064 015 A (NYIRI LASZLO K ET AL) 20 December 1977 see claims 1,16; figures	1-4
Y	---	5,6
Y	US 2 281 457 A (S.O. ROSENQVIST) 28 April 1942 see claims; figures ---	5,6
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

11 July 1997

Date of mailing of the international search report

18.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/01473

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90 09454 A (BRUKER ANALYTISCHE MESSTECHNIK) 23 August 1990 see claims 1,5,10,16 -----	1,2,4-6
Y		5,6

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/01473

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
FR 2293488 A	02-07-76	DE 2457044 A CH 618736 A ZA 7507515 A		28-10-76 15-08-80 24-11-76
FR 2184035 A	21-12-73	US 3926738 A DE 2323416 A GB 1434613 A US 3926737 A		16-12-75 29-11-73 05-05-76 16-12-75
US 4064015 A	20-12-77	NONE		
US 2281457 A	28-04-42	NONE		
WO 9009454 A	23-08-90	DE 3903778 A EP 0457789 A		16-08-90 27-11-91

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01473

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12M1/36

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprustoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprustoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 293 488 A (SICK PETER) 2.Juli 1976 siehe Seite 3, Zeile 8 - Zeile 28; Ansprüche; Abbildungen	1-4
Y	siehe Seite 4, Zeile 2 - Seite 8, Zeile 7 ---	5,6
X	FR 2 184 035 A (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO) 21.Dezember 1973 siehe Ansprüche; Abbildungen	1-4
Y	siehe Ansprüche 1-6,10,21,23,28; Abbildungen	5,6
X	US 4 064 015 A (NYIRI LASZLO K ET AL) 20.Dezember 1977	1-4
Y	siehe Ansprüche 1,16; Abbildungen ---	5,6
Y	US 2 281 457 A (S.O. ROSENQVIST) 28.April 1942 siehe Ansprüche; Abbildungen ---	5,6
	-/-	

 Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definieren, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Später Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11.Juli 1997

18.07.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Coucke, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01473

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Heir. Anspruch Nr.
X	WO 90 09454 A (BRUKER ANALYTISCHE MESSTECHNIK) 23.August 1990 siehe Ansprüche 1,5,10,16 -----	1,2,4-6
Y		5,6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/01473

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2293488 A	02-07-76	DE 2457044 A CH 618736 A ZA 7507515 A	28-10-76 15-08-80 24-11-76
FR 2184035 A	21-12-73	US 3926738 A DE 2323416 A GB 1434613 A US 3926737 A	16-12-75 29-11-73 05-05-76 16-12-75
US 4064015 A	20-12-77	KEINE	
US 2281457 A	28-04-42	KEINE	
WO 9009454 A	23-08-90	DE 3903778 A EP 0457789 A	16-08-90 27-11-91

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)